

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Laura Vinklerová

Vodorozpuštné polymerní nanomateriály v protinádorové terapii

Watersoluble polymer nanomaterials tailored for anti-tumor therapy

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Tomáš Etrych, Ph.D., DSc.

Praha, 2020

### Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9.10.2020

.....  
Laura Vinklerová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Etrychovi, PhD., DSc. za umožnění vypracování bakalářské práce na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, za skvělé vedení, rady, ochotu a trpělivost. Také chci poděkovat panu Ing. Šubrovi, CSc. za cenné rady, Albertu Koválikovi za pomoc a vstřícnost při zpracovávání úloh a celému Ústavu makromolekulární chemie za vytvoření hezké pracovní atmosféry.

Děkuji i své rodině za podporu a trpělivost během mého studia.

## Abstrakt

Protinádorová léčba zahrnuje několik terapeutických postupů. Jedním z nich je chemoterapie využívající nízkomolekulární cytostatická léčiva, jejichž nevýhodou je celosystémový projev cytostatických účinků i ve zdravé tkáni. V důsledku toho se na konci minulého století přišlo s novým konceptem vysokomolekulárních polymerních nanomateriálů, které minimalizují vedlejší účinky léčby. Vazba léčiva na polymerní nanomateriál umožňuje zlepšit biodistribuci léčiva v těle a tím snížit jeho toxicitu, a zároveň často vede k významnému navýšení protinádorové aktivity.

Struktura zmíněných vysokomolekulárních polymerních nanomateriálů a jejich konjugátů s léčivou využívá rozdílů mezi zdravou a nádorovou tkání. Jednou z významných odlišností je produkce enzymů matrix metaloproteináz v nádorovém mikroprostředí, která se zejména využívá k uvolňování léčiva vázaného na polymerní nosič v nádorové tkáni.

**Klíčová slova:** polymerní nanomateriál, matrix metaloproteináza, uvolnění léčiva, penetrace, efekt EPR

## Abstract

Anti-tumor treatment involves several therapeutic approaches. One of them is chemotherapy which uses low-molecular-weight cytostatic drugs, whose disadvantage is the systemic manifestation of cytostatic effects even in healthy tissue. As a result, at the end of the last century, a new concept of high molecular weight polymer nanomaterials was introduced that minimized the side effects of treatment. The binding of the drug to the polymeric nanomaterial makes it possible to improve the biodistribution of the drug in the body and thereby reduce its toxicity, while often leading to a significant increase in anti-tumor activity. The structure of the high-molecular-weight polymer nanomaterials and their drug conjugates utilizes the differences between healthy and tumor tissue. One of the important difference is the production of matrix metalloproteinase enzymes in the tumor microenvironment, which is mainly used to release polymer-bound drug in tumor tissue.

**Keywords:** polymer nanomaterial, matrix metalloproteinase, release of the drug, penetration, EPR effect

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vodorozpustné polymerní nanomateriály v nádorové léčbě .....</b>	<b>2</b>
2.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti polymerních nanomateriálů .....	2
2.2	Syntéza a struktura vodorozpustných polymerních nanomateriálů .....	2
2.3	Pasivní akumulace a aktivní cílení polymerních nanomateriálů v nádorech .....	5
2.4	Vazba a uvolnění léčiva z polymerního konjugátu .....	7
<b>3</b>	<b>Vznik nádorového onemocnění a protinádorová terapie .....</b>	<b>8</b>
3.1	Imunitního systém jako ochrana před vznikem nádoru a jeho reakce na vznik nádoru .....	8
3.2	Protinádorová terapie a využití polymerních nanomateriálů v léčbě nádorových onemocnění.....	9
3.2.1	Struktura a vlastnosti matrix metaloproteináz.....	10
3.2.2	Role matrix metalo proteinázy v progresi nádorových buněk .....	12
3.2.3	Využití matrix metaloproteináz v dopravě polymerních nosičů a v aktivaci léčiva.....	13
3.2.3.1	Uvolnění a aktivace léčiva pomocí matrix metaloproteináz .....	14
3.2.3.2	Cílená degradace polymerního nosiče závislá na matrix metaloproteinázách .....	15
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>18</b>

## Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ECM	extracelulární matrix (extracellular matrix)
EPR	zvýšená propustnost a zadrž (enhanced permeability and retention)
PHPMA	polymer N-(2-hydroxypropyl)methacrylamidu
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MMP	matrix metaloproteináza (matrix metalloproteinase)
NK	přirození zabíječi (natural killers)
NKT	přirození zabíječi T-buňky (natural killer T cells)
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

# 1 Úvod

Především v posledních dvou dekádách druhé poloviny dvacátého století se v rámci nádorové terapie začaly studovat přístupy, které využívaly nových znalostí o roli imunitního systému u nádorových onemocnění. V podobné době se současně rozšířil i výzkum nosičových systémů léčiv založených na rozličných materiálech, například vysokomolekulárních polymerních nanomateriálech.

Farmakokinetika léčiva je u těchto nosičových systémů řízena strukturou a vlastnostmi nosiče jak po celou dobu transportu, tak i v okamžiku uvolnění aktivního léčiva v požadovaném místě v organismu. Léčivo je buď zachyceno uvnitř nanomateriálu na základě hydrofobních a elektrostatických interakcí, nebo kovalentně navázáno na polymerní nosič. Tím je docíleno výhodnější biodistribuce léčiva v organismu, jeho stabilizace proti degradaci, zvýšení rozpustnosti a snížení vedlejších účinků léčiva na zdravé části organismu.

Při designu polymerních nanomateriálů se využívá rozdílů mezi mikroprostředím nádoru a prostředím zdravé tkáně. Rozdíly můžeme najít jak v konstrukci nádorového mikroprostředí, tak v buněčném metabolismu a zvýšené expresi některých molekul nádorovými buňkami. Zvýšená exprese specifických molekul může být využita k aktivaci nosičových systémů, například k uvolnění léčiva v prostředí nádoru enzymatickým působením matrix metaloproteináz.

Cílem bakalářské práce je popis polymerních nanomateriálů a jejich využití v protinádorové terapii. Důraz je kladen na systémy využívající stimuly asociované s nádorovým mikroprostředím, především na aktivitu matrix metaloproteináz v léčebném procesu.



## 2 Vodorozpustné polymerní nanomateriály v nádorové léčbě

### 2.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti polymerních nanomateriálů

Fyzikálně-chemické vlastnosti polymerních nanomateriálů jsou určujícím faktorem při jejich využití v nádorové léčbě. „Ideální“ polymerní nanomateriál by měl být biokompatibilní, netoxický a neimunogenní. V krevním řečišti by měl cirkulovat po dostatečně dlouhou dobu, aby mohlo dojít k jeho akumulaci v nádorové tkáni, nikoliv ve tkáni zdravé. Po dopravě a uvolnění léčiva, které nese, by měl být následně odstraněn z organismu.

Jeden z faktorů, který přispívá k prodloužení doby cirkulace polymerního nanomateriálu v krevním řečišti, je jeho vysoká molekulová hmotnost, která brání rychlé eliminaci z organismu renální filtrací a umožňuje tak vychytávání nádorem (Etrych et al., 2011). Dalším faktorem je celkový náboj polymerního nanomateriálu, kdy odstraňování negativně nabitých molekul renální filtrací je omezeno, kdežto u pozitivně nabitých molekul je filtrace zvýšena (Rennke, Venkatachalam, & Patel, 1979).

Aby bylo zajištěno odstranění polymerního nanomateriálu z organismu, musí být buď degradovatelný, nebo jeho molekulová velikost nesmí překročit limit renální filtrace. Tím se zabráni jeho nechtěné akumulaci v organismu poté co léčivo bylo doručeno a uvolněno (Yang & Kopeček, 2014).

### 2.2 Syntéza a struktura vodorozpustných polymerních nanomateriálů

Vodorozpustné polymerní nanomateriály určené pro dopravu léčiv by měly splňovat tři základní kritéria: chránit léčivo před degradací během transportu, dopravit léčivo do cílové tkáně nebo buněk a umožnit jeho řízené uvolňování (Chytil et al., 2017).

Jako vodorozpustné polymerní nosiče se uplatňují různé polymerní materiály, především jsou studovány kopolymery na bázi N-(2-hydroxypropyl)methacrylamidu (PHPMA). PHPMA byly vybrány pro jejich vhodné vlastnosti; jsou biokompatibilní, neimunogenní a netoxické. Kopolymery PHPMA jsou studovány jako účinné nosiče léčiv, přičemž nosič může nést nejenom léčivo, ale i směrující komponentu (viz obr. 1) (Chytil et al., 2017).

Požadavkem na vývoj konjugátů polymer-léčivo je, aby struktura polymerního nanomateriálu umožnila dodání léčiva ke specifickému cíli. Používají se dvě strategie cílení konjugátu, aktivní a pasivní (viz kapitola 2.3.). Aktivní cílení je založeno na specifických interakcích směřujících skupin na polymerním nanomateriálu a receptorů na buněčné membráně nádorových buněk. Pasivní cílení, přesněji pasivní akumulace, využívá vysokou molekulovou hmotnost polymerního nanomateriálu, který je následně akumulován v pevných nádorech díky efektu zvýšené permeability a zádrže (EPR) (Maeda, Greish, & Fang, 2006). Správný design a z něj odvozená struktura polymerního nanomateriálu významně ovlivňuje distribuci konjugátu v těle a tím i jeho biologickou aktivitu (Ulbrich & Šubr, 2010).

Při studiu PHPMA nosičů se nejčastěji využívá kovalentní vazby léčiva na polymerní nanomateriál, což ve většině případů vede k tomu, že je léčivo po dobu dopravy na nosiči neaktivní. Vázané neaktivní léčivo je následně uvolněno v cílovém místě s pomocí specifického stimulu a stává se z něj léčivo aktivní (viz kapitola 2.4). Tato strategie zlepšuje rozpustnost léčiva, prodlužuje cirkulaci v krevním oběhu a snižuje nežádoucí vedlejší účinky (Kostka & Etrych, 2016).

S cílem významně prodloužit dobu cirkulace polymerního nosiče v krevním oběhu jsou nanomateriály určené pro dopravu léčiv připravovány o molekulové hmotnosti, která je vyšší, než je jejich limit renální filtrace. Tyto nosiče dělíme do dvou podskupin podle biologické degradovatelnosti hlavního polymerního řetězce na polymery s biologicky rozložitelným hlavním řetězcem a na polymery s biologicky rozložitelnými vazbami mezi základními polymerními bloky (Chytil et al., 2017).

Biologicky rozložitelné polymerní nosiče nejsou omezeny molekulovou hmotností, protože jsou po splnění jejich funkce v organismu rozloženy na malé fragmenty, které jsou z těla odstraněny renální filtrací. Naopak biologicky nerozložitelné polymerní nanomateriály nesmí přesahovat molekulovou hmotnost danou limitem renální filtrace (Chytil et al., 2017).

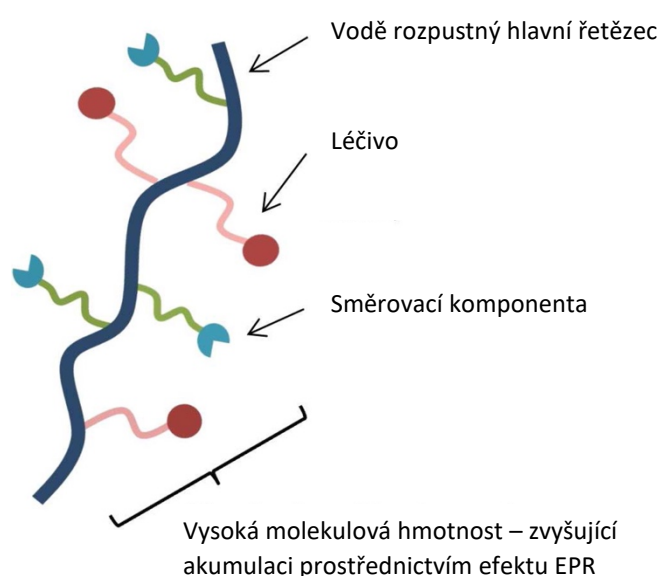
Základní částí konjugátů polymer-léčivo na bázi PHPMA je nerozložitelný lineární HPMa kopolymer s molekulovou hmotností pod limitem renální filtrace (Ulbrich & Šubr, 2010).

Aby se dosáhlo významného uplatnění EPR efektu, prodloužené krevní cirkulace a následného odstranění polymerního nosiče z těla, využívají se polymery s vysokou molekulovou hmotností a degradovatelnými spojkami, které tvoří struktury roubované, multiblokové a hvězdčité (Kostka & Etrych, 2016).

Hvězdicovité polymerní konjugáty jsou tvořeny dendrimerovým jádrem, na které jsou přes biodegradovatelnou spojku připojeny semitelehelické lineární HPMA kopolymery s pomocí reaktivní skupiny na konci hlavního řetězce (Chytil et al., 2017). Výhodou hvězdicovitých polymerů je jejich vysoká molekulová hmotnost, která zajišťuje dlouhodobou krevní cirkulaci a zvýšenou akumulaci v nádoru. Konjugát díky těmto vlastnostem vykazuje při nízkých koncentracích skvělý proti nádorový účinek (Etrych et al., 2012).

Další vysokomolekulární strukturou využitelnou jako nosič léčiv jsou polymerní micely, které se tvoří z amfifilních kopolymerů, například s pomocí navázané vysoce hydrofobní látky na lineární HPMA kopolymer nesoucí léčivo. Ve vodném prostředí micely tvoří supramolekulární strukturu s hydrofobním jádrem obklopeným hydrofilními polymery (Ulbrich & Šubr, 2010). Tyto micelární nosiče mohou být z organismu vyloučeny v podobě unimerů renální filtrací (Chytil et al., 2017), a to po poklesu jejich koncentrace pod tzv. kritickou micelární koncentraci. Jejich akumulace v pevných nádorech je srovnatelná s hvězdicovými polymerními konjugáty o podobném hydrodynamickém rozměru (Kostka & Etrych, 2016).

Polymerní nanomateriály na bázi PHPMA se syntetizují dvěma způsoby: volnou radikálovou polymerací nebo řízenou radikálovou polymerací. V poslední době se více využívá řízená radikálová polymerace, při níž lze dosáhnout lépe definované struktury polymeru s nižší disperzitou (Chytil et al., 2017).



Obr. 1: Ringsdorfův model konjugátu polymer-léčivo - upraveno (Larson & Ghandehari, 2012).

## 2.3 Pasivní akumulace a aktivní cílení polymerních nanomateriálů v nádorech

Koncept využívající cílení polymerních nanomateriálů do tkáně pevných nádorů je studován v mnoha laboratořích světa s cílem překonat nízkou specifitu a omezit vedlejší účinky nízkomolekulárních léčiv při léčbě nádorových onemocnění (viz obr. 2) (Kopeček & Kopečková, 2010). Rozeznáváme dvě strategie cílení polymerních nanomateriálů do nádorové tkáně, pasivní akumulaci a aktivní směřování.

Pasivní akumulace využívá efekt zvýšené propustnosti a zádrže (EPR) (Maeda et al., 2006), který je založen na abnormalitách nádorové tkáně. Nádorové krevní cévy se vyznačují abnormalitami (viz obr. 3), které vedou ke zvýšené vaskulární propustnosti. Podobně se chovají i nádorové lymfatické cévy, které buď chybí, nebo jsou nefunkční, což vede k neefektivnímu odvádění látek z nádorové oblasti. Efektu EPR se využívá u polymerních nanomateriálů, které tak mohou do nádorové tkáně vstoupit a akumulovat se zde ve velké míře (Danhier, Feron, & Prétat, 2010).

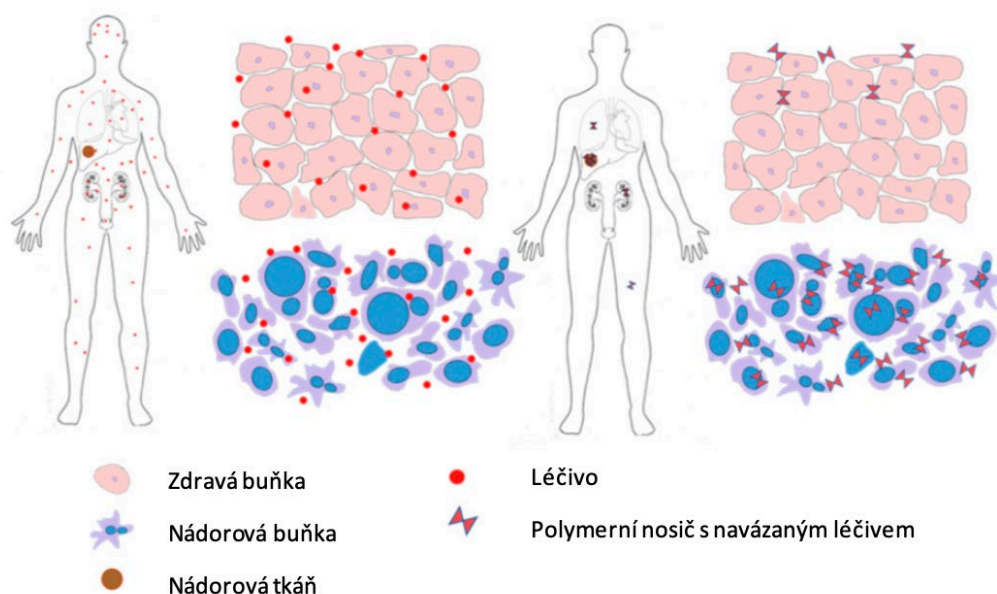
Polymerní nanomateriál bude do nádorové tkáně dopraven v důsledku EPR efektu, pokud splňuje tyto základní vlastnosti: má dostatečnou velikost, aby nebyl přednostně odstraněn renální filtrací a prodloužila se tak doba, po kterou bude cirkulovat v krevním oběhu. Jeho celkový náboj je neutrální až mírně záporný a má strukturu, která ho „skrývá“ před vyhledáním retikuloendoteliálním systémem (Danhier et al., 2010; Owens & Peppas, 2006).

Využitelnost EPR efektu pro dopravu polymerních nanomateriálů závisí také na detailních vlastnostech mikroprostředí nádorové tkáně: jeho vaskularizaci, angiogenezi, intersticiálním tlaku v nádorové tkáni a míře funkčnosti lymfatické drenáže. (Bae, 2009; Heldin, Rubin, Pietras, & Östman, 2004)

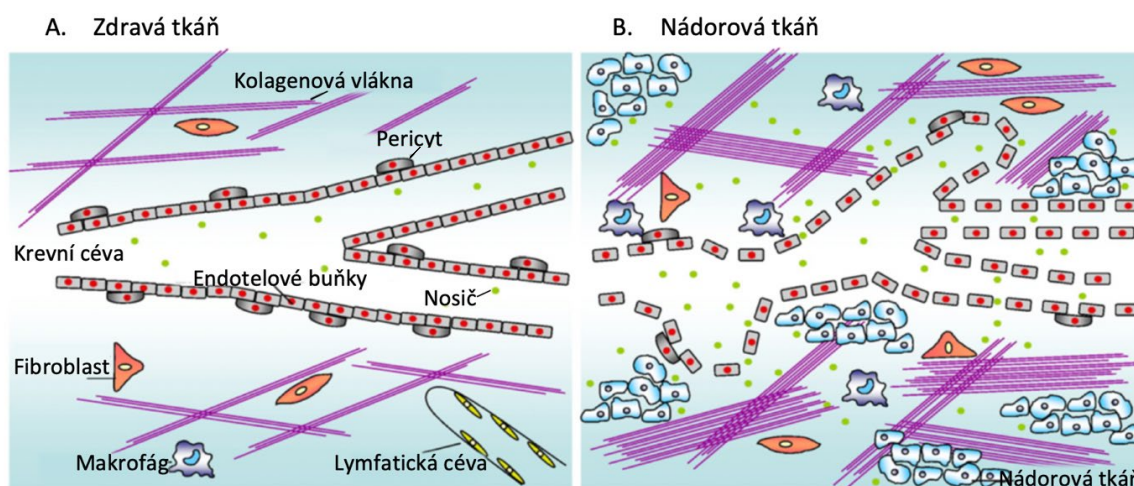
Pasivní akumulace v nádorové tkáni, které využívá většina polymerních nanomateriálů, je u pevných nádorů součástí cílení aktivního. Aktivním cílením rozumíme připojení směřující komponenty k polymernímu nanomateriálu, která má vysokou afinitu k receptorům vyskytujícím se v cílové nádorové tkáni. Směřující komponenty mohou být monoklonální protilátky a jejich fragmenty, oligopeptidy nebo oligosacharidy. Specifické receptory, na které směřující komponenty cílí, by neměly být exprimovány ve velké míře ve tkáni zdravé (Adams et al., 2001; Gosk, Moos, Gottstein, & Bendas, 2008)

Distribuce nízkomolekulárního léčiva

Distribuce polymerního nosiče s navázaným léčivem



Obr. 2: Nízkomolekulární léčiva jsou distribuována nejen do nádorové tkáně, ale jsou také široce distribuována do zdravých tkání, což vede k toxickým vedlejším účinkům (vlevo); Polymerní nanomateriál je navržen tak, aby zvyšoval svou aktivitu tím, že se přednostně hromadí v nádorové tkáni. Dochází k využití fenestrované vaskulatury a nevyvinuté lymfatické drenáže, které umožňují rozvinutí EPR efektu (vpravo) – upraveno (Dragojevic et al., 2015)



Obr. 3: Rozdíly mezi normálními a nádorovými tkáněmi, které jsou předpokladem pasivní akumulace polymerních nanomateriálů EPR efektem. A. Normální tkáň obsahuje dobře vyvinuté krevní cévy. Kolagenová vlákna, fibroblasty a makrofágy jsou v extracelulární matici. Je vyvinut lymfatický systém. B. Nádorová tkáň obsahuje nedostatečně vyvinuté, silně fenestrované krevní cévy. Extracelulární matrice obsahuje více kolagenových vláken, fibroblastů a makrofágů než v normální tkáni. Lymfatický systém chybí nebo je špatně funkční – upraveno (Heldin et al., 2004).

## 2.4 Vazba a uvolnění léčiva z polymerního konjugátu

Tumorigeneze je doprovázena změnami v mikroprostředí příslušné tkáně a často vede k rezistenci k běžně používaným protinádorovým léčebným postupům založeným na nízkomolekulárních léčivech (Chlapek, Chovanová, & Veselská, 2014). Tento fakt lze obejít například přípravou polymerních nosičů, ve kterých je léčivo navázáno v neaktivní formě na polymerní nanomateriál s pomocí enzymaticky degradovatelné nebo pH citlivé spojky. Tím se dosáhne omezení nežádoucí toxicity neseného léčiva ve zdravé tkáni, protože léčivo může být uvolněno a aktivováno až na požadovaném místě účinku, v nádorové tkáni nebo buňkách. Z těchto důvodů se žádoucí biologické aktivity léčiva, za níž považováno především uvolnění a aktivace léčiva v nádorové tkáni nebo buňkách a současně snížení jeho toxicity, dosáhne navázáním léčiva v neaktivní formě na polymerní nanomateriál prostřednictvím enzymaticky degradovatelné nebo pH citlivé spojky. (Chytil et al., 2017; Ulbrich & Šubr, 2010).

Většina enzymaticky degradovatelných spojek využívaných v systémech pro dopravu léčiv je založena na oligopeptidech, které jsou degradovatelné některými z lysozomálních enzymů. Výhodou je velmi specifické uvolnění, kdy přednostně dochází k uvolnění léčiva v nádorových buňkách. Na druhou stranu tyto konkrétní lysozomální enzymy, které jsou nezbytné pro aktivaci léčiva, nejsou produkovány v dostatečné míře všemi typy nádorových buněk (Chytil et al., 2017).

Alternativou k enzymaticky degradovatelným spojkám jsou spojky citlivé na změnu pH v mikroprostředí nádorové tkáně. Změny pH v rámci nádorového mikroprostředí jsou spjaty s abnormalitami nádorové vaskularizace, a změnami buněčného metabolismu nádorových buněk vedoucí k zvýšené produkci laktátu a  $\text{CO}_2$ , které vedou k přítomnosti hypoxických oblastí a oblastí se sníženým pH, které je důležité právě pro rozpad spojky citlivé na mírně kyselé pH (Chlapek et al., 2014).

Základní předpokladem v případě pH-senzitivních systémů je, že konjugát polymer-léčivo je dostatečně stabilní a inaktivní při neutrálním pH během transportu krevním řečištěm a dochází k uvolnění léčiva v aktivní formě až v mikroprostředí nádoru vykazující mírně kyselé pH. Výhodou tohoto přístupu je nezávislost na přítomnosti lysozomálních enzymů, naopak nevýhodou je uvolňování menšího množství léčiva ve fyziologickém pH během transportu (Chytil et al., 2017).

Kromě výše zmíněných strategií se k doručení léčiva do nádorové tkáně může využít i nadměrné exprese matrix metaloproteináz v nádorové tkáni (viz kapitola 3.2.3). Využití matrix metaloproteináz v protinádorové léčbě je poměrně nové téma, v současné době probíhá řada studií využívajících jejich aktivitu pro uvolnění a aktivaci léčiva nebo pro degradaci polymerního nosiče (viz kapitola 3.2.3).

### 3 Vznik nádorového onemocnění a protinádorová terapie

#### 3.1 Imunitního systém jako ochrana před vznikem nádoru a jeho reakce na vznik nádoru

Nádorová onemocnění vznikají díky změnám, které umožnily nádorovým buňkám nekontrolovaně růst. U těchto buněk dochází v důsledku genetických mutací, epigenetických změn nebo virové aktivity k poškození buněčného cyklu a následnému nekontrolovanému růstu. Klíčová je změna zejména v oblastech stability genomu, buněčného dělení nebo autoregulace.

Buněčný cyklus je proces, kdy buňka roste, replikuje svojí deoxyribonukleovou kyselinu (DNA), a nakonec se rozdělí na dvě dceřiné buňky. Tento cyklus se skládá ze čtyřech fází: G1, S, G2 a M fáze. Mezi přechody jednotlivých fází jsou tzv. kontrolní body, které monitorují, zda nedošlo k poškození DNA a zda buňka může pokračovat do další fáze. Buňka může reverzibilně přejít i do tzv. G0 fáze z G1 fáze v případě, že obdrží nedostatek růstových signálů. V G1 fázi se nachází tzv. restriční bod, který určuje, zda buňka přijala nezbytné růstové signály a může přejít z G1 do S fáze. Jsou-li tyto signály dostatečné, buňka projde restričním bodem a po zbytek buněčného cyklu nebude tyto signály vyžadovat. Pokud však buňka neobdržela příslušné podněty, neprochází tímto bodem a místo toho přejde do fáze G0. Restriční bod se liší od ostatních kontrolních bodů v tom, že výslovně neurčuje, zda je genom neporušený. Je však nezbytným kontrolním bodem tím, že omezuje proliferaci buněk (Garrett, 2001; Planas-Silva & Weinberg, 1997).

Pohyb buněčným cyklem a přechod mezi jednotlivými fázemi je regulován cyklin-dependentními kinázami (Malumbres & Barbacid, 2009).

Dojde-li k pochybení při regulaci a nekontrolovatelné buněčné proliferaci, přichází na řadu imunitní systém. Už počátkem dvacátého století Paul Ehrlich vyslovil teorii, že imunitní systém potlačuje růst nádorových buněk. V této době ale věda měla nedostatečné informace o funkcích imunitního systému. S nabývajícimi znalostmi bylo toto téma znovu otevřeno o 50 let později F. Macfarlane Burnetem a Lewisem Thomasem (Dunn, Old, & Schreiber, 2004).

V obraně proti nádorovým buňkám hraje roli jak vrozený tak i adaptivní imunitní systém, především přirození zabíječi (NK), přirození zabíječi T-buňky (NKT) a T-lymfocyty (Dunn, Old, Schreiber, et al., 2004). Nejvíce imunogenní buňky jsou rozpoznány a eliminovány, naopak nejméně imunogenní buňky díky nízké expresi hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) nejsou rozpoznány a zničeny a dochází tak k jejich rozvoji (Candeias & Gaip, 2016).

Kromě zmíněné nízké exprese MHC a špatné prezentaci nádorového antigenu, mohou nádorové buňky uniknout imunitnímu systému produkcí imunosupresivních faktorů, změnou exprese molekul zapojených do signalizace apoptózy či adaptací mechanismu cytotoxicity od buněk imunitního systému, která následně nádorové buňky využívají k obraně proti buňkám imunitního systému (Antony et al., 2008).

V součtu jsou znaky nádorových onemocnění charakterizovány autonomií v produkci růstových signálů, sníženou citlivostí na inhibiční růstové signály, poruchou řízení buněčné smrti (apoptózy), možností nekonečné replikace, růstem nových cév (angiogeneze), tkáňovou invazivitou a metastazováním.

### 3.2 Protinádorová terapie a využití polymerních nanomateriálů v léčbě nádorových onemocnění

Prodlužování lidského věku s sebou přináší i řadu negativ. Jedním z nich je zvýšený výskyt nádorových onemocnění. Důvody vzniku a jejich rozvoje lze hledat nejenom na buněčné úrovni těla, ale i v životním stylu jednotlivce a v prostředí, ve kterém žije (Society, 2018). Včasná diagnóza nádorového onemocnění je klíčem k výrazně vyšší pravděpodobnosti úspěšné léčby.

V současné době zahrnují terapeutické postupy chirurgické odstranění nádorového ložiska, chemoterapii, radioterapii nebo imunoterapii. Zmíněné metody jsou často



kombinovány. V chemoterapii se uplatňují především nízkomolekulární cytostatická léčiva, která ovlivňují životaschopnost a dělení nádorových buněk. Jejich nevýhodou je často nespecifický účinek, vysoká cytotoxicita a dlouhodobé vedlejší účinky (Kopeček & Kopečková, 2010).

V průběhu posledních dekád se výzkum zaměřil na překonání zmíněných nevýhod klasických protinádorových léčiv, například vývojem vysokomolekulárních nosičových systémů vhodných pro cílenou dopravu nízkomolekulárních léčiv do místa účinku (Kopeček & Kopečková, 2010).

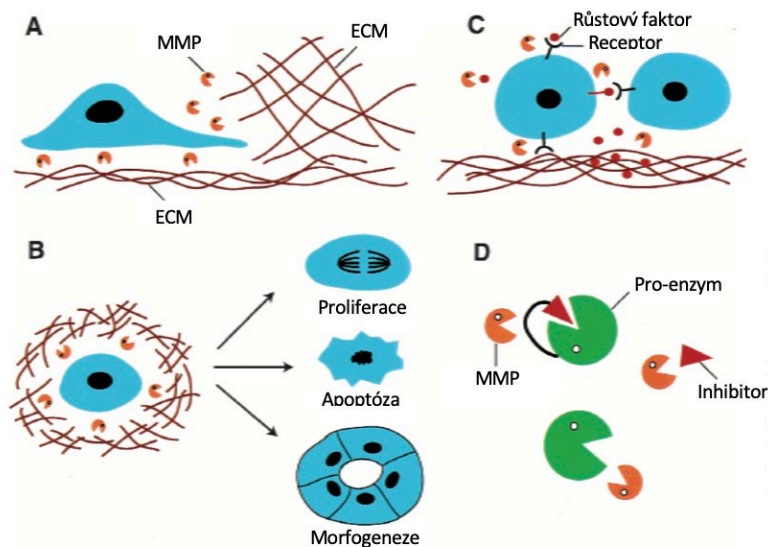
S prvním modelem vysokomolekulárního dopravního systému přišel Helmut Ringsdorf v 70. letech minulého století. Tento model představuje polymerní nosič, na který je mimo jiné navázáno léčivo (viz obr. 1, kapitola 2.2) (Ringsdorf, 1975).

S rozšiřujícími znalostmi o progresi nádorových onemocnění se začalo při návrhu struktur dopravních systémů léčiv využívat specifických rozdílů mezi prostředím zdravé tkáně a mikroprostředím nádoru. Pozornost se zaměřila přímo na mikroprostředí nádoru, kde dochází k expresi řady molekul, jako jsou povrchové antigeny specifické pro nádorové buňky, specifické receptory na nádorové vaskulatuře a specifické enzymy hojně přítomné v nádorové tkáni, například matrix metalo proteinázy. Tyto enzymy mají řadu rolí v progresi nádorového onemocnění, převážně jsou ale spojeny s procesem růstu nádoru a vzniku metastáz. Proto se v rámci vědeckého výzkumu obrátila pozornost i na tyto enzymy.

### 3.2.1 Struktura a vlastnosti matrix metaloproteináz

Matrix metalo proteinázy (MMP) jsou endopeptidázy závislé na iontech zinku a vápníku, jejichž funkcí je degradace extracelulární matrix (ECM) a modulace aktivity biologicky aktivních molekul, jako jsou růstové faktory nebo receptory růstových faktorů, jejich štěpením nebo uvolněním z ECM (viz obr. 4) (Vu & Werb, 2000; Yoon, Park, Yun, & Chung, 2011).

Podílejí se na několika biologických procesech, jako jsou například vývoj, remodelace tkáně při hojení ran, ale i například během patologických procesů (Pilcher et al., 1997; Yoon et al., 2011).



Obr. 4: Způsoby působení matrix metaloproteináz: (A) MMP mohou ovlivnit buněčnou migraci změnou buněk z adhezivních na neadhezivní a degradací ECM. (B) MMP mohou změnit mikroprostředí ECM, což vede k buněčné proliferaci, apoptóze nebo morfogenezi. (C) MMP mohou modulovat aktivitu biologicky aktivních molekul, jako jsou růstové faktory nebo receptory růstových faktorů, jejich štěpením nebo uvolněním z ECM. (D) MMP mohou změnit proteázovou aktivitu štěpením enzymů nebo jejich inhibitorů (Vu & Werb, 2000).

MMP lze rozdělit podle preference substrátu či podobnosti strukturních domén na podskupiny: kolagenázy, gelatinázy, stromelyzinázy, membránové matrix metalo proteinázy (MT-MMP) (Vu & Werb, 2000).

MMP mohou být z buněk sekretovány v inaktivní formě, ve formě tzv. pro-enzymu nebo mohou být membránově-asociované (MT-MMP) (Nagase, Visse, & Murphy, 2006).

Mají tři základní domény: N-terminální propeptid, katalytickou doménu a C-terminální doménu. Za udržení enzymu v inaktivní formě a později i za jeho aktivaci, je zodpovědná N-terminální propeptidová doména, kde hlavní roli hraje aminokyselina cystein, která prostřednictvím thiolové skupiny interaguje se zinkovým iontem a udržuje tak enzym v inaktivním stavu. K aktivaci většiny MMP *in vivo* dochází pomocí proteolýzy ostatními aktivovanými MMP nebo serinovými proteázami (Egeblad & Werb, 2002; Murphy & Knäuper, 1997). Katalytická doména obsahuje ionty zinku a vápníku, kde ionty vápníku stabilizují tuto doménu (Dhanaraj et al., 1996) C-terminální doména slouží k protein-proteinové interakci (Vignot & Spano, 2007).

Za normálních fyziologických podmínek jsou MMP regulovány na třech úrovních: pomocí transkripce, aktivací pro-enzymy a pomocí specifických inhibitorů MMP. Mezi

inhibitory patří tkáňové inhibitory matrix metaloproteináz (TIMP) a  $\alpha$ 2-makroglobulin (Folgueras, Pendás, Sánchez, & López-Otín, 2004; Nagase et al., 2006; Sottrup-Jensen & Birkedal-Hansen, 1989)

### 3.2.2 Role matrix metalo proteináz v progresi nádorových buněk

U nádorového onemocnění byla pozorována zvýšená exprese MMP a jejich role v jeho progresi. Tyto enzymy jsou produkovány jak nádorovými buňkami, tak i buňkami stromálními přítomnými v nádoru (Egeblad & Werb, 2002).

Původně se předpokládalo, že působení MMP je především během vývoje metastáz. Postupně se ale ukázalo, že se zapojují i do dalších procesů vývoje nádoru, jako jsou regulace růstu, apoptózy, angiogeneze a únik před imunitním systémem (Egeblad & Werb, 2002; Hanahan & Weinberg, 2000).

MMP mohou podporovat růst nádoru uvolňováním prekursorů růstových faktorů, které jsou vázané na buněčnou membránu nebo díky svým účinkům na složení extracelulární matrix mohou nepřímo regulovat růstové signály prostřednictvím integrinů. Integriny jsou povrchové buněčné receptory, které přenáší signál mezi ECM a buňkami a ovlivňují tak buněčný cyklus, proliferaci a diferenciaci. (Agrez, Chen, Cone, Pytela, & Sheppard, 1994; Peschon et al., 1998).

Další fází progresu nádorového onemocnění je jeho expanze do okolních tkání a orgánů, pro kterou je důležitá regulace angiogeneze. Angiogeneze je proces, během něhož dochází k tvorbě nových krevních cév. MMP napomáhají angiogenezi degradací extracelulární matrix a zvýšením dostupnosti angiogenního vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) (Seandel, Noack-Kunmann, Zhu, Aimes, & Quigley, 2001).

S expanzí nádorových buněk úzce souvisí tvorba metastáz. Metastáze je několika krokový proces, při kterém se nádorové buňky přesunou z primárního místa vzniku nádorového onemocnění do okolních tkání či orgánů a často bývají hlavní příčinou smrti (Yoon et al., 2011). Buňka musí z tkáně projít do krevních či lymfatických cév a zase z nich vystoupit pochodem nazývaným intravazace, pro kterou jsou opět důležité MMP (Kim, Yu, Kovalski, & Ossowski, 1998).

S výše zmíněným je úzce spjat i proces maskování nádorových buněk před odhalením buňkami imunitního systému, mezi které patří T-lymfocyty, přirození zabíječi (NK), neutrofily

a makrofágy. Tyto buňky by měly nádorové buňky eliminovat. Právě zde mají MMP roli při ochraně nádorových buněk tím, že umí potlačovat proliferaci nebo diferenciaci buněk imunitního systému, aktivovat jejich inhibitory a inhibovat chemoatraktanty pro neutrofile a makrofágy (Boulay et al., 2001; Sheu et al., 2001; Yu & Stamenkovic, 2000).

### 3.2.3 Využití matrix metaloproteináz v cílené dopravě pomocí polymerních nosičů a v aktivaci léčiva

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, za fyziologických podmínek jsou MMP v organismu regulovány. U nádorových onemocnění však dochází k jejich nadměrné expresi, čímž hrají významnou úlohu v rozvoji nádoru. Z tohoto důvodu se MMP staly předmětem výzkumu protinádorové léčby. V devadesátých letech minulého století se výzkum zaměřil také na využití MMP jako aktivačního prostředku degradace polymerních nosičů s navázaným léčivem (Vartak & Gemeinhart, 2007).

Jedním z úskalí protinádorové léčby je hustá kolagenová matrice nádoru, přes kterou vysokomolekulární polymerní nanomateriály s vázanými léčivy, vzhledem k jejich velikosti, špatně prostupují, čímž je efektivita protinádorové léčby snížena. Centrum nádorového mikroprostředí obsahuje nejagresivnější nádorové buňky, které, v případě že nebudou eliminovány, hrozí znovuoobením nádoru. Mimoto vystavení nádorových buněk subletální koncentraci léčiva může usnadnit rozvoj jejich rezistence (Wong et al., 2011). V důsledku toho byl navržen postup, který usnadní průnik polymerních nosičů až k nejagresivnějším nádorovým buňkám a je schopný překonat výše zmíněné bariéry (viz kapitola 3.2.3.2) (Wong et al., 2011). Kromě toho MMP našly uplatnění i při snižování toxicity léčiva pro zdravé tkáně a při jeho řízeném uvolňování (viz kapitola 3.2.3.1).

Nevýhodou využití MMP je, že ačkoliv jsou robustními endogenními podněty, jsou méně kontrolovatelné a flexibilní ve srovnání s exogenními stimuly. Jejich produkce je úzce spojena s určitým typem a stádiem rozvoje nádorového onemocnění. Navíc se ne všechny MMP vyskytují pouze v nádorech (Egeblad & Werb, 2002).

### 3.2.3.1 Uvolnění a aktivace léčiva pomocí matrix metaloproteináz

Žádoucím efektem moderní protinádorové léčby je řízené uvolňování léčiva až v cílovém místě nádorové tkáně a snížení jeho toxicity pro tkáň zdravou, v níž nedochází k uvolnění léčiva. Za tímto účelem se mohou využít enzymy přítomné v nádorovém mikroprostředí, například MMP, které svým působením uvolňují a aktivují léčivo navázaného na polymerní nosič až v cílové části organismu.

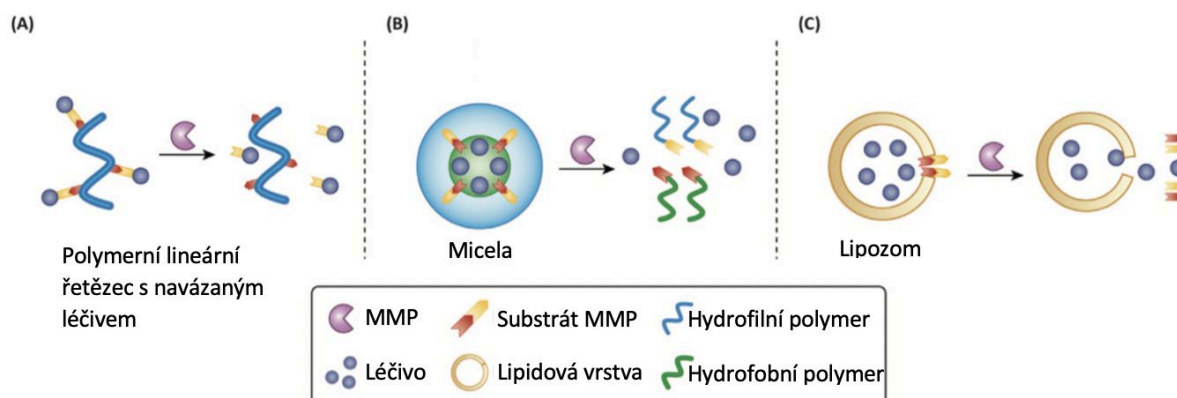
Popsány byly tři způsoby výše zmíněného uvolňování léčiva v cílovém místě (viz obr. 5) (Yao, Kou, Tu, & Zhu, 2018). V prvním případě je léčivo navázáno přes peptidovou spojku na polymerní nosič. Peptidová spojka je MMP-senzitivní a je štěpena v přítomnosti matrix metaloproteináz v mikroprostředí nádoru (viz obr. 5A) (Vartak & Gemeinhart, 2007). Při navrhování tohoto typu konjugátu musí být brána v potaz substrátová specifita MMP, protože použitý peptid by měl být rozpoznán pouze MMP, aby se zabránilo nespecifickému uvolnění léčiva jinými enzymy ve zdravých tkáních a nedocházelo tak k nežádoucím vedlejším účinkům (Chau, Padera, Dang, & Langer, 2006).

Vzhledem k tomu, že MMP štěpí převážně daný substrát uprostřed řetězce aminokyselin, vzniká po rozštěpení peptidové spojky ve většině případů konjugát oligopeptid-léčivo, kde jsou jedna až čtyři aminokyseliny stále připojené k léčivu. Z tohoto důvodu je při designu tohoto systému nutné otestovat aktivitu uvolněného derivátu léčiva oproti volnému léčivu, zda není modifikací aminokyselinami aktivita snížena. Zbylé aminokyseliny mohou účinnost léčiva snižovat, což se může projevit v nutnosti navýšit dávku polymerního nosiče s navázaným léčivem. Oligopeptid, který zbyde na léčivu po štěpení MMP může být navržen tak, že je dále štěpen dalšími přítomnými enzymy v nádorovém mikroprostředí (Vartak & Gemeinhart, 2007) na samotné původní léčivo.

Při druhém způsobu uvolňování léčiva se využívá micel tvořených amfifilním polymerem s peptidovými spojkami mezi hydrofilními a hydrofobními částmi polymeru, která je v přítomnosti MMP rozštěpena (viz obr. 5B). U tohoto systému by během transportu krevním řečištěm nemělo docházet k výraznějšímu uvolnění léčiva. K jeho uvolnění by mělo dojít až specificky v nádoru, kde se po degradaci spojek micela rozpadne a léčivo se uvolní a projeví se zvýšená protinádorová účinnost (Yao et al., 2018; Zhang et al., 2016).

Třetí způsob uvolnění léčiva využívá lipozomy, ve kterých může být léčivo umístěno, jak ve vodné kapse, tak v hydrofobní části lipozomální dvojvrstvy. K uvolnění léčiva se

využívá MMP9-senzitivní lipopeptidová spojka, která je za přítomnosti MMP štěpená. Dojde k narušení lipozomu a následnému uvolnění léčiva. (viz obr. 5C) (Yao et al., 2018).



Obr. 5: Způsoby uvolnění a aktivace léčiva: (A) Uvolnění léčiva z polymeru štěpením peptidové spojky (B) Uvolnění léčiva destabilizací micely (C) Uvolnění léčiva destabilizací lipozomu – upraveno (Yao et al., 2018).

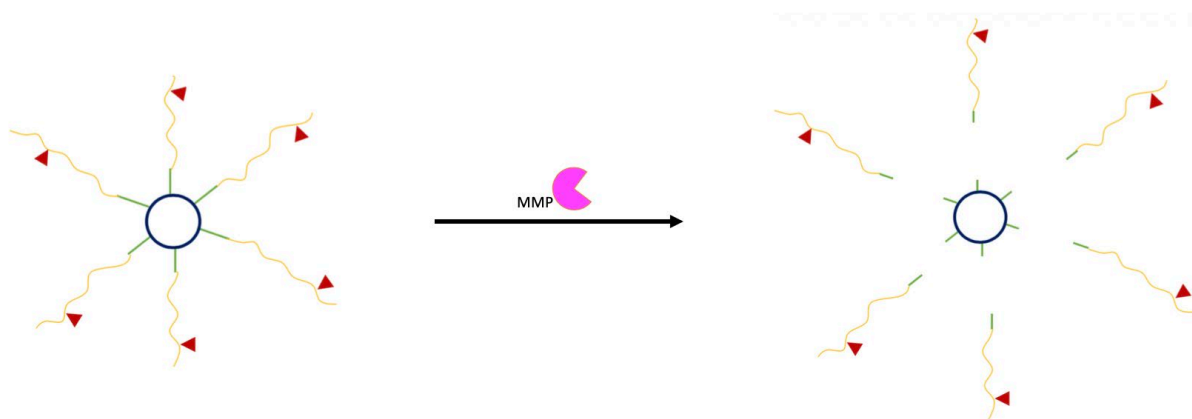
### 3.2.3.2 Cílená degradace polymerního nosiče závislá na matrix metaloproteinázách

MMP se mohou s úspěchem využívat také pro cílenou degradaci polymerních dopravních systémů s cílem zajistit hlubší penetraci polymerního nosiče s navázaným léčivem v nádorovém mikroprostředí a dosáhnout tak jeho zvýšené účinnosti a následnou eliminaci polymerního řetězce z organismu (Wong et al., 2011). Zvýšené akumulace konjugátu v celém objemu nádoru lze docílit s pomocí dvou krokového procesu, během něhož dochází k výrazné změně velikosti polymerního nosiče.

Tento proces jako první krok využívá EPR efektu (viz kapitola 2.3), při němž se vysokomolekulární polymerní nosič díky své velikosti akumuluje v nádorové tkáni. Jeho velikost je v tomto případě i jeho nevýhodou, protože konjugát nemůže hlouběji prostupovat tkání a léčivo se tak nemůže dostat k hlouběji umístěným nádorovým buňkám nádorové tkáně. Tím se efektivita protinádorové léčby snižuje.

Z tohoto důvodu se do polymerního nosiče vkládá MMP-senzitivní peptidová spojka, která se v přítomnosti MMP rozštěpí. Uvolní se menší fragmenty polymerního nosiče s léčivem, které mohou díky své významně nižší velikosti hlouběji prostupovat nádorovou tkání (viz obr. 5) (Yao et al., 2018).

Výsledkem dvou krokového procesu je akumulace polymerního konjugátu v nádoru s pomocí EPR efektu s následným rozštěpením peptidové spojky MMP a uvolnění a hluboký průnik menších polymerních fragmentů s léčivem k nádorovým buňkám.



Obr. 6: Schématické znázornění cílené degradace polymerního nosiče. Polymerní dopravní systém je složen z: dendrimerového jádra (tmavě-modře), MMP-senzitivní oligopeptidové spojky (zeleně), lineárního polymerního řetězce (žlutě) s navázaným léčivem (červeně) (zdroj: vlastní zpracování).

## 4 Závěr

Vysokomolekulární polymerní dopravní systémy využívající MMP umožňují řízené uvolňování léčiva až v požadovaném místě v organismu, například využitím specifického štěpení biodegradovatelných spojek přítomných v jejich struktuře s pomocí MMP. Tyto systémy zároveň mohou být připraveny pro cílenou degradaci polymerního řetězce a hlubší penetraci degradovaných částí polymerního nosiče s navázaným léčivem nádorovým mikroprostředím. S pomocí těchto enzymů se tedy docílí žádoucí biologické aktivity léčiva, tj. zvýšené efektivity protinádorové léčby a snížené toxicity pro zdravou tkáň.

Mírnou nevýhodou využití MMP je jejich různá exprese a funkce během jednotlivých stádií nádorových onemocnění, což může mít za následek ztíženou efektivitu léčby u některých nádorových onemocnění. Nicméně, vzhledem k jejich významné roli v progresi nádorových onemocnění a s tím spojené elevaci jejich koncentrace ve většině nádorových typů, je potřebné pokračovat v jejich studiu a zabývat se jejich dalším využitím při navrhování struktur polymerních nosičů léčiv. Už jenom to, že jsou nadměrně exprimovány nádorovými buňkami, z těchto enzymů dělá využitelné selektivní látky umožňující aktivaci nesených léčiv v definovaném cílovém místě v organismu.

Jiným přístupem protinádorové terapie je kombinace inhibice MMP při současné léčbě polymerními nosiči s navázanými léčivy aktivovatelná v nádorovém prostředí. Tento postup by mohl vést k současné inhibici růstu nádoru, cestou inhibice štěpení ECM a přímým efektem na nádorové buňky.

Velký potenciál se stále skrývá v přístupu cílené degradace polymerního nosiče za účelem hlubší penetrace směrem k nádorovým buňkám, který by mohl účinně zasáhnout velkou masu nádorových buněk a tím zabránit relapsu nádorového onemocnění.



## 5 Seznam použité literatury

- Adams, G. P., Schier, R., McCall, A. M., Simmons, H. H., Horak, E. M., Alpaugh, R. K., ... Weiner, L. M. (2001). High affinity restricts the localization and tumor penetration of single-chain Fv antibody molecules. *Cancer Research*.
- Agrez, M., Chen, A., Cone, R. I., Pytela, R., & Sheppard, D. (1994). The  $\alpha\beta 6$  integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the  $\beta 6$  cytoplasmic domain. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.2.547>
- Antony, P. A., Piccirillo, C. A., Akpınarli, A., Finkelstein, S. E., Speiss, P. J., Surman, D. R., ... Schleimer, R. P. (2008). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Immunity*. <https://doi.org/10.1038/nri1806>
- Bae, Y. H. (2009). Drug targeting and tumor heterogeneity. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.074>
- Boulay, A., Masson, R., Chenard, M. P., El Fahime, M., Cassard, L., Bellocq, J. P., ... Rio, M. C. (2001). High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. *Cancer Research*.
- Candeias, S. M., & Gaip, U. S. (2016). The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*.
- Chau, Y., Padera, R. F., Dang, N. M., & Langer, R. (2006). Antitumor efficacy of a novel polymer-peptide-drug conjugate in human tumor xenograft models. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.21495>
- Chlápek, P., Chovanová, S., & Veselská, R. (2014). Tumor Microenvironment – Possibilities of the Research Under In Vitro Conditions. *Klinická Onkologie*. <https://doi.org/10.14735/amko20141s48>
- Chytil, P., Kostka, L., & Republic, C. (n.d.). *Structural design and synthesis of polymer prodrugs*.
- Danhier, F., Feron, O., & Préat, V. (2010). To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>
- Dhanaraj, V., Ye, Q. Z., Johnson, L. L., Hupe, D. J., Ortwine, D. F., Dunbar, J. B., ... Blundell, T. L. (1996). X-ray structure of a hydroxamate inhibitor complex of stromelysin catalytic domain and its comparison with members of the zinc metalloproteinase superfamily. *Structure*. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00043-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00043-3)
- Dragojevic, S., Ryu, J. S., Raucher, D., Rades, T., Grohgan, H., & Löbmann, K. (2015). Polymer-based prodrugs: Improving tumor targeting and the solubility of small molecule drugs in cancer therapy. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules201219804>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>

- Dunn, G. P., Old, L. J., Schreiber, R. D., Louis, S., Burnet, F. M., & Thomas, L. (2004). *IFN $\gamma$  in immunoedit review.pdf*. 21, 137–148.
- Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc745>
- Etrych, T., Kovář, L., Strohalm, J., Chytil, P., Říhová, B., & Ulbrich, K. (2011). Biodegradable star HPMA polymer-drug conjugates: Biodegradability, distribution and anti-tumor efficacy. *Journal of Controlled Release*, 154(3), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.06.015>
- Etrych, T., Šubr, V., Strohalm, J., Šírová, M., Říhová, B., & Ulbrich, K. (2012). HPMA copolymer-doxorubicin conjugates: The effects of molecular weight and architecture on biodistribution and in vivo activity. *Journal of Controlled Release*, 164(3), 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.029>
- Folgueras, A. R., Pendás, A. M., Sánchez, L. M., & López-Otín, C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: From new functions to improved inhibition. *International Journal of Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041811af>
- Garrett, M. D. (2001). Cell cycle control and cancer. *Current Science*.
- Gosk, S., Moos, T., Gottstein, C., & Bendas, G. (2008). VCAM-1 directed immunoliposomes selectively target tumor vasculature in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.12.021>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. *Cell*.
- Heldin, C. H., Rubin, K., Pietras, K., & Östman, A. (2004). High interstitial fluid pressure - An obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1456>
- Kim, J., Yu, W., Kovalski, K., & Ossowski, L. (1998). Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81478-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81478-6)
- Kopeček, J., & Kopečková, P. (2010). HPMA copolymers: Origins, early developments, present, and future. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.004>
- Kostka, L., & Etrych, T. (2016). High-molecular-weight HPMA-based polymer drug carriers for delivery to tumor. *Physiological Research*.
- Larson, N., & Ghandehari, H. (2012). Polymeric conjugates for drug delivery. *Chemistry of Materials*. <https://doi.org/10.1021/cm2031569>
- Maeda, H., Greish, K., & Fang, J. (2006). The EPR effect and polymeric drugs: A paradigm shift for cancer chemotherapy in the 21st century. *Advances in Polymer Science*. [https://doi.org/10.1007/12\\_026](https://doi.org/10.1007/12_026)
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9, 153. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nrc2602>

- Murphy, G., & Knäuper, V. (1997). Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the “Hemopexin” domain? *Matrix Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(97\)90025-1](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(97)90025-1)
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69(3), 562–573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>
- Owens, D. E., & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., ... Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1281>
- Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G., & Parks, W. C. (1997). The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.6.1445>
- Planas-Silva, M. D., & Weinberg, R. A. (1997). The restriction point and control of cell proliferation. *Current Opinion in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80076-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80076-2)
- Rennke, H., Venkatachalam, M., & Patel, Y. (1979). Glomerular Permeability of Macromolecules NEUTRAL HORSE RADISH PEROXIDASE IN THE RAT. *Journal of Clinical Investigation*, 63(April), 713–717.
- Ringsdorf, H. (1975). STRUCTURE AND PROPERTIES OF PHARMACOLOGICALLY ACTIVE POLYMERS. *J Polym Sci Polym Symp*.
- Seandel, M., Noack-Kunmann, K., Zhu, D., Aimes, R. T., & Quigley, J. P. (2001). Growth factor-induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.8.2323>
- Sela, Y. (2004). ( 12 ) Patent Application Publication ( 10 ) Pub . No .: US 2004 / 0253304 A1. 1(19).
- Sheu, B. C., Hsu, S. M., Ho, H. N., Lien, H. C., Huang, S. C., & Lin, R. H. (2001). A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Research*.
- Society, A. C. (2018). Cancer Facts & Figures 2018. *American Cancer Society*. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-687814>
- Sottrup-Jensen, L., & Birkedal-Hansen, H. (1989). Human fibroblast collagenase- $\alpha$ -macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian  $\alpha$ -macroglobulins. *Journal of Biological Chemistry*.
- Ulbrich, K., & Šubr, V. (2010). Structural and chemical aspects of HPMA copolymers as drug carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(2), 150–166. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.10.007>
- Vartak, D., & Gemeinhart, R. (2007). Matrix metalloproteases: Underutilized targets for drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. <https://doi.org/10.1080/10611860600968967>

- Vignot, S., & Spano, J. P. (2007). Matrix metalloproteinases. *Targeted Therapies in Oncology*, 315–332.
- Vu, T. H., & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.815400>
- Wong, C., Stylianopoulos, T., Cui, J., Martin, J., Chauhan, V. P., Jiang, W., Fukumura, D. (2011). Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018382108>
- Yang, J., & Kopeček, J. (2014). Macromolecular therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 190(801), 288–303. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.013>
- Yao, Q., Kou, L., Tu, Y., & Zhu, L. (2018). MMP-Responsive ‘Smart’ Drug Delivery and Tumor Targeting. *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.06.003>
- Yoon, S.-O., Park, S.-J., Yun, C.-H., & Chung, A.-S. (2011). Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Metastasis and Angiogenesis. *BMB Reports*, 36(1), 128–137. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2003.36.1.128>
- Yu, Q., & Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF- $\beta$  and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes and Development*.
- Zhang, X., Wang, X., Zhong, W., Ren, X., Sha, X., & Fang, X. (2016). Matrix metalloproteinases-2/9-sensitive peptide-conjugated polymer micelles for site-specific release of drugs and enhancing tumor accumulation: Preparation and in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S101030>